ACTA ARACHNOL., **34**: 1-9, 1985

カブトガニ類の胚発生に及ぼす塩分濃度の影響*

杉田博昭

筑波大学生物科学系，〒305 茨城県新治郡桜村天王台 1-1-1

村上公信

流山中央高等学校，〒207-01 千葉県流山市大畔 275-5

関口晃一

上武大学商学部，〒372 群馬県伊勢崎市戸谷塚町 634-1

Synopsis

Sugita, Hiroaki (Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba, Sakura-mura, Niihari-gun, Ibaraki, 305 Japan), Murakami, Kiminobu (Nagareyama-chuou High School, Nagareyama-shi, Chiba, 270-01 Japan) & Sekiguchi, Koichi (Business Department, Jobu University, Isesaki-shi, Gunma, 327 Japan): The effects of salinity on embryonic development of the horseshoe crabs. *Acta arachnol.*, **34**: 1-9 (1985).

Horseshoe crabs are found in coastal and estuarine areas and, when the tide is on the flow, the mature adults migrate shorewards to spawn on sandy beaches. The salinity measured was 18-33‰ in Tatara coast where Japanese horseshoe crabs were laying eggs. Therefore, eggs and embryos as well as adults of horseshoe crabs were expected to tolerate a moderate reduction in salinity. In this experiment, the eggs of four horseshoe crab species, *Tachypleus tridentatus*, *T. gigas*, *Carcinoscorpius rotundicauda*, and *Limulus polyphemus*, were artificially inseminated and reared until hatching in different salinities ranging from 5‰ to 35‰. The embryos of all the four species were considered adaptable to the salinity ranges of their natural localities. The viability of *C. rotundicauda* embryos in low salinity was the lowest of all horseshoe crabs, though only *C. rotundicauda* goes up a river to spawn on the muddy banks of the river below the highest tidal level.

Robertson (1970) は，北米産のアメリカカブトガニ，*Limulus polyphemus*, が春から夏にかけて産卵のためにくる海岸や河口の海水の塩分濃度が6‰から32‰の広い範囲にわたっていることを，多くの文献を引用して記している。アメリカカブトガニの血液が正常海水中で等張的なのか高張的なのかに関しては，古くから議論されてきた (Garrey, 1905; Dailey *et al.*, 1931; Cole,

---

[*] 筑波大学下田臨海実験センター業績 No. 453.

1940) が，ROBERTSON (1970) はアメリカカブトガニ成体の血液は，100～200％海水中では等張で，10～66％の希釈海水中では高張であると結論した。

一方，アジア産のカブトガニ類，*Tachypleus tridentatus* (カブトガニ)，*T. gigas* (ミナミカブトガニ)，*Carcinoscorpius rotundicauda* (マルオカブトガニ) のうち，カブトガニとミナミカブトガニは，アメリカカブトガニと同じように大潮の満潮時頃に海岸や河口の満潮線近くの砂中に産卵するが，マルオカブトガニはマングローブ地帯を流れる川の河口から 300～1,000 m も上流の河岸の砂泥地や泥地に産卵する (SEKIGUCHI *et al.*, 1977)。カブトガニ類の産卵場所は，干潮時には直接日光にさらされたり，また雨に洗われたりするので，カブトガニ類の卵は環境の塩分濃度変化に対して強い耐性があると思われ，特にマルオカブトガニではそれが著しいのではないかと予測される。しかしこのような観点に立ってカブトガニ類の胚発生を調べた研究はほとんどない。最近アメリカカブトガニを用いて，JEGLA & COSTLOW (1982) は，塩分濃度を10，20，30，および40‰，温度を25，20～25，25～30，および30～35°C とし，また LAUGHLIN (1983) は，塩分濃度を10，15，25，および35‰，温度を20，25，30，および35°C にして，各塩分濃度と温度を組み合わせ，それぞれの条件における卵から第5齢幼生まで (JEGLA & COSTLOW, 1982) あるいは卵から第2齢幼生まで (LAUGHLIN, 1983) の発生速度を調べた。これらの実験では，海岸から集めてきた産卵後の卵を用いて，主に幼生の成長速度への影響を調べている。われわれは4種のカブトガニ類の人工受精卵を用いて，いろいろな塩分濃度における胚の発生速度および発生率を調べたのでここに報告する。

材料および方法

カブトガニ *Tachypleus tridentatus* は北九州沿岸で採集した。ミナミカブトガニ *T. gigas* とマルオカブトガニ *Carcinoscorpius rotundicauda* はタイ国の Bangsaen 海岸で採集されたものを，またアメリカカブトガニ *Limulus polyphemus* は米国 Woods Hole の海洋生物実験所に採集を依頼したものを，それぞれ航空貨物便で取り寄せた。これらの材料を用いた以下の実験のほとんどは，筑波大学下田臨海実験センターで，1979年～1982年の7～8月の間に行われた。ただし実験1のアメリカカブトガニの飼育は1975年7月に米国の Duke 大学臨海実験所で行われた。

人工媒精は，雌の頭胸部腹面をメスで切り開いて卵を取り出し，濾過海水で十分に洗った後，精子を含んだ雄の体液を海水でうすめたものをかけて行った (関口，1971)。カブトガニ類の発生段階は関口の発生段階表 (SEKIGUCHI, 1973; SEKIGUCHI *et al.*, 1982) に従って決めた。発生速度は，形態上の特徴が顕著なため確実に発生段階を決めることのできる第1回胚脱皮期 (1EM, Stage 18)，第2回胚脱皮期 (2EM, Stage 19)，第3回胚脱皮期 (3EM, Stage 20)，第4回胚脱皮期 (4EM, Stage 21)，および孵化に達するまでの日数で表わした。

いろいろな塩分濃度下での飼育は，媒精の翌日から20，25，30，および35‰の海水中で (実験1)，あるいは一定の発生段階すなわち関口の Stage 2～3 (分裂核が卵表に出現する時期)，Stage 6 (胞胚期) および Stage 12 (胚帯形成初期) になったものを集めて5，10，15，20，25，30および35‰の海水中で (実験2のI，II，III) 行った。海水の塩分濃度は，海水の比重と温度を測定し，換算表に従って求めた。下田臨海実験センター付近の海水の塩分濃度は通常約35‰であったので，この海水を蒸留水で希釈して各塩分濃度の飼育海水を調製した。卵は直径約 8 cm 高さ約 4.5 cm

のガラスボウルに入れ，30°C の恒温器内で飼育し，1日2回海水を交換した。ただし実験1のアメリカカブトガニ卵の飼育は直径約 6cm　高さ約 3cm のガラスボウルを用いて行った。なお，カブトガニ類の卵を1つの容器の中で多数飼育すると発生が遅れることがわかっていたので，4種の卵の飼育は密度による発生速度の遅れを無視できるよう，なるべく少数の卵を用いて行った。また，卵の大きい種ほど少数の卵を使用した。

結果および考察

実験1．媒精1日後から孵化までの飼育

Fig. 1 は，カブトガニの卵を40個ずつ各塩分濃度の海水で飼った時の胚の発生速度を示している。図中の各点は，50%以上の胚が縦軸の発生段階（3EM, 4EM, 孵化）に達した時点を媒精後の日数で表わしたものである。すなわち，50%の胚が 3EM となったのは，20，25および30‰で飼育した場合はいずれも媒精後26日目で，35‰の場合は27日目であった。4EM となったのは，20および25‰では媒精後38日目，30‰では37日目，35‰では40日目であった。同様に，孵化したのは20，25，30，および35‰のものでそれぞれ42，44，42，および45日目であった。なお各塩分濃度におけ

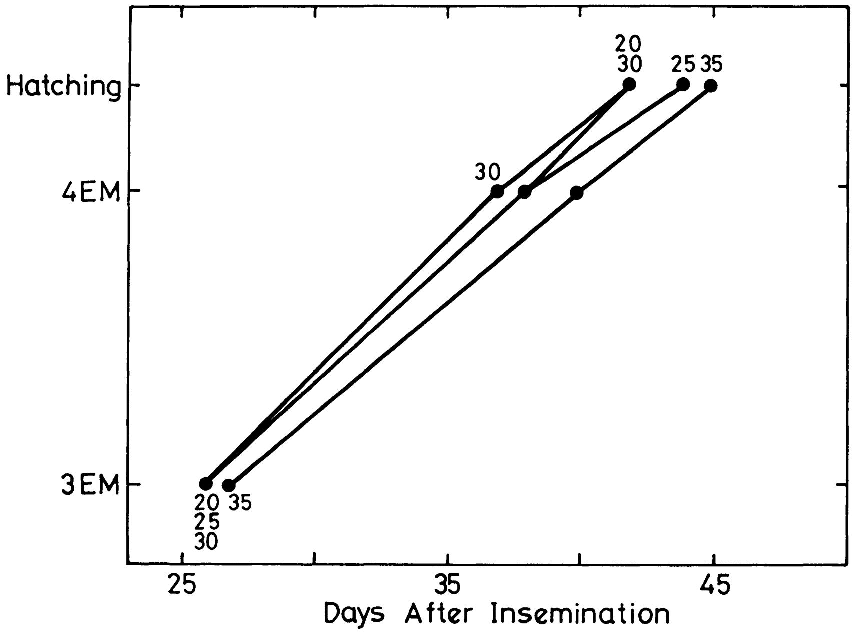

Fig. 1. Salinity effect on developmental events of *Tachypleus tridentatus* embryos. The day that each developmental event (3EM, 4EM, or Hatching) happens to the 50% of the cultured embryos is represented by solid circle. 3EM, the 3rd embryonic molt; 4EM, the 4th embryonic molt. The number at solid circle indicates the salinity.

る卵の発生率はすべて90％以上であった。

Fig. 2 は，マルオカブトガニ卵を用いて行った同様の実験の結果を示している。卵の数は，各塩分濃度につきそれぞれ120個で発生率は79～83％であった。50％の胚が3EMになるまでの媒精後の日数は各塩分濃度下で23～28日の間に，また孵化するまでの日数は同じく37～42日の間にあった。

これらの結果は，この2種ともここで用いられた塩分濃度下では胚の発生速度にほとんど差がないことを示している。

ミナミカブトガニ（用いられた卵数40個，発生率60％以下）では，50％の胚が3EM，4EMおよび孵化にいたるまでの日数は，塩分濃度20，25，および30‰の場合，それぞれ21～25，32～36，および35～42日であった。35‰では3EM，4EMおよび孵化にいたるまでの日数は，それぞれ27，39，および44日であった。またアメリカカブトガニ（用いられた卵数150個，発生率90％以上）では，塩分濃度20，25，および30‰の下で50％の胚が孵化するまでの日数はいずれも18～19日であり，35‰の下では21日であった。すなわち，ミナミカブトガニおよびアメリカカブトガニでもここで用いられた塩分濃度下では胚の発生速度に差がほとんどなかった。ただし，4種とも35‰では他の塩分濃度より幾分発生が遅くなる傾向が認められた。

Laughlin (1983) がアメリカカブトガニ幼生の発生速度を調べた結果でも，30°Cでは10～25‰の間で差はなく，35‰でやや遅くなっていた。Jegla & Costlow (1982) によれば，40‰で飼育

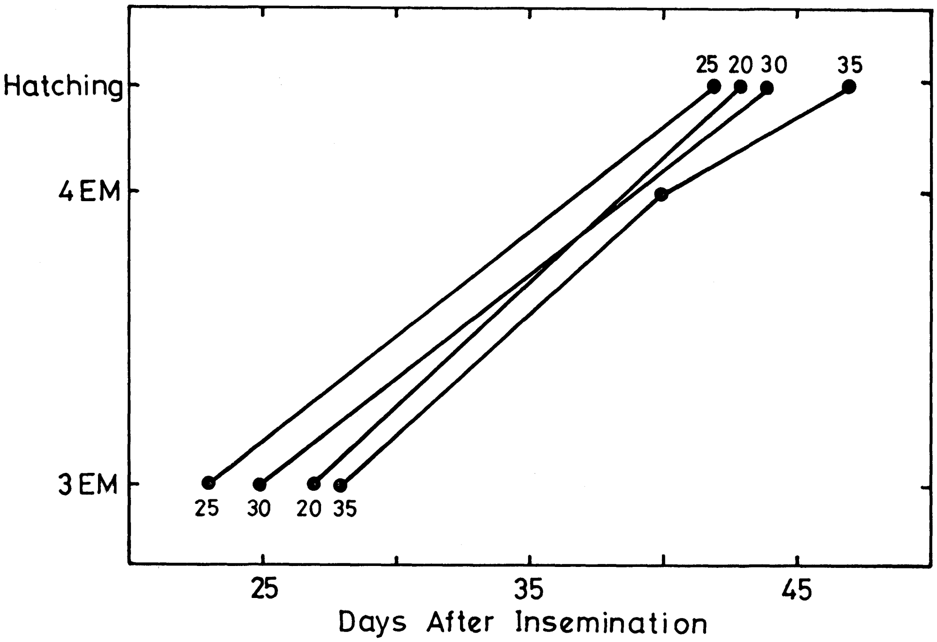

Fig. 2. Salinity effect on developmental events of *Carcinoscorpius rotundicauda* embryos. The day that each developmental event (3EM, 4EM, or Hatching) happens to the 50% of the cultured embryos is represented by solid circle. 3EM and 4EM are as described in Fig. 1. The number at solid circle indicates the salinity.

した場合（25°Cと30°Cに1日置きに入れている）のアメリカカブトガニの孵化は，10〜30‰で飼育した場合と比べるとかなり遅れていた。

以上のことから，カブトガニおよびアメリカカブトガニの卵の発生は，産卵場所の塩分濃度18〜33‰（伊万里市，多々良海岸で実測），20〜32‰（アメリカカブトガニの産卵海岸：Ayers, 1959; Robertson, 1970 による）によく適応しているように思われる。ミナミカブトガニとマルオカブトガニの産卵場所の塩分濃度は調べられていないが，おそらく同様のことが言えるものと推察される。

実験2．分裂核の出現期（I），胞胚期（II）および胚帯形成期（III）から孵化までの飼育

各塩分濃度における飼育実験の開始時期を3通りに分けて行った場合の胚の発生率を Table 1 に示してある。各飼育実験に用いた卵数は，卵の大きさに応じてミナミカブトガニで20個，カブトガニで30個，マルオカブトガニで100個，そしてアメリカカブトガニでは150個である。

実験Ⅰ，Ⅱでは，5‰で4種全部のカブトガニ類の卵が発生できず，10‰でマルオカブトガニの卵のみが発生できなかった。また15‰ではミナミカブトガニとアメリカカブトガニの卵の発生率が高かった。カブトガニとマルオカブトガニでは実験Ⅰの15‰における発生率がかなり低かった。実験Ⅲでは，ミナミカブトガニとマルオカブトガニで，5‰における発生率が20‰以上の場合と同じ程度の高さであった。これら5‰で発生した卵のうちで，マルオカブトガニにおいてのみ約90%の胚に種々の奇形が出現したが，他の3種ではそのような奇形は認められなかった。

Table 1. The viability (%) of horseshoe crab embryos cultured in experimental seawater of various salinities.

		Salinity (‰)						
		5	10	15	20	25	30	35
Tachypleus tridentatus	I	0	7	13	40	63	57	63
	II	0	37	50	37	73	67	67
	II	23	67	73	77	63	63	67
Tachypleus gigas	I	0	70	80	75	80	85	90
	II	0	95	85	95	85	85	75
	III	95	95	100	90	100	100	100
Carcinoscorpius rotundicauda	I	0	0	19	83	78	81	82
	II	0	0	75	83	88	81	82
	III	86	81	91	89	93	83	80
Limulus polyphemus	I	0	96	98	97	96	97	98
	II	0	71	72	78	84	87	90
	III	49	84	88	91	93	89	90

Embryos at each stage (I, II, or III) were removed from normal into experimental seawater. I: Sekiguchi (1973)'s stages 2-3 (the appearance and multiplication of cleavage nuclei), II: stage 6 (the completion of the blastoderm layer), III: stage 12 (the germ band formation).

Table 2. Salinity effect on developmental events of horseshoe crab embryos.

		Salinity (‰)													
		5		10		15		20		25		30		35	
Tachypleus tridentatus	I					23	27	20	24	18	24	17	24	19	24
						39	—	34	39	34	—	32	38	35	40
	II			23	30	19	22	19	23	17	21	17	22	17	22
				—	—	31	—	33	—	31	37	31	38	34	39
	III	15	18	12	15	9	13	9	13	9	13	10	13	11	15
		—	—	27	—	25	—	25	—	25	—	25	—	28	—
Tachypleus gigas	I			21	26	19	23	18	23	17	21	18	23	18	23
				36	38	32	34	31	33	29	31	31	33	32	34
	II			20	22	17	21	16	20	17	21	15	20	17	21
				33	35	31	34	29	31	30	33	29	31	32	35
	III	12	17	9	14	8	11	8	12	8	12	8	12	9	13
		—	—	23	26	21	23	22	24	23	25	23	25	23	26
Carcinoscorpius rotundicauda	I							17	21	17	22	16	20	18	24
								—	—	—	—	—	—	—	—
	II					14	18	14	18	14	17	13	16	15	18
						28	32	28	32	27	31	27	32	29	33
	III	12	17	9	12	8	12	9	13	9	12	9	12	10	13
		—	—	22	26	22	26	23	—	22	26	22	—	24	—
Limulus polyphemus	I			9	11	8	10	8	11	8	11	8	10	8	10
				17	18	16	17	16	18	16	18	16	18	16	18
	II					9	11	8	10	8	10	8	10	8	10
						16	17	15	16	16	17	16	17	16	17
	III			8	10	6	8	6	8	6	8	5	7	5	7
				17	18	14	16	14	15	15	16	12	14	13	15

The time that each developmental event happens to the 50% of the cultured embryos is shown in compartments by the number of days after the starting time (I, II, or III). The numbers in each compartment show lengths (days) from the start to the 2nd embryonic molt (upper, left), to the 3rd embryonic molt (upper, right), to the 4th embryonic molt (lower, left), and to the hatching (lower, right). I, II, and III are as described in Table 1.

Ⅰとほぼ同じ条件の実験で，ミナミカブトガニ卵は7.5‰でも発生するものがあったが，それはわずかに10％にすぎなかった。また，マルオカブトガニの卵は15‰でも発生可能（発生率は20％）であったが，12.5‰以下ではまったく発生できなかった。

以上の結果から，アメリカカブトガニとミナミカブトガニの卵は低塩分濃度（10〜15‰）に対して高い耐性を示すこと，およびマルオカブトガニの卵が最も低い耐性を示すことがわかった。

この結果はまた，マルオカブトガニの卵が海岸線よりはるかに離れた河岸に産みつけられる（Sekiguchi *et al.*, 1977）ことから，本種の卵が最も低塩分濃度に耐えられるのではないかとした予測に，まったく反するものである。現在のところ，この点に関しては次のような解釈が可能であると思われる。すなわち第1には，マルオカブトガニの産卵場所は川の通常の水面より高い位置にあるので，干潮時には川の流れに洗われることはなく，一方，満潮時には溯上してきた海水におおわれるのだから，他のカブトガニ類の産卵場所に比べて特にそこの塩分濃度がいつも低いというわけではないと思われることである。第2には，一度正常な塩分濃度の海水に浸されれば，卵内の囲卵液（カブトガニ類の卵殻の下に，卵表からの分泌物により形成される内卵膜の内側の液で，胚はこの中に浮んでいる）はまもなく，その海水とほぼ同じ塩分濃度になってしまう（Sugita & Sekiguchi, 1981）のであるから，実験で行ったように長時間低塩分濃度にさらされ続けることは自然状態ではあり得ないと思われることである。

Table 2 は，各塩分濃度における胚の発生速度を，飼育を開始した時点から50％の卵がそれぞれの発生段階に達した時点までの日数で表わしたものである。各小区画の上段の左の数字は飼育開始から 2EM までの日数を，右の数字は 3EM までの日数をそれぞれ示している。同様に，下段の左と右の数字は，4EM と孵化までの日数をそれぞれ示している。同じ発生段階から飼育を始めたものでは，どの種においても，塩分濃度のちがいによる発生速度の差はほとんど認められない。また，飼育を開始した時期の異なるもの（ⅠとⅡとⅢ）の間では，例えば 2EM から 3EM までの日数（Table 2 の各小区画中の上段の日数の差）を比較してみると，これもまたどのカブトガニ類においてもほとんど差がない。すなわち，カブトガニ類のそれぞれの種における発生速度は，2EM 後では，10〜35‰の間でほとんど差がないと言える。しかし，10‰や15‰で飼育した場合の人工媒精から孵化までの日数は，どのカブトガニ類においても，20〜35‰で飼育した場合より長くなっていた。また，10‰で飼育した方が15‰の場合より，孵化までの日数がさらに長くなっていた。

これらのことから，カブトガニ類においては，低塩分濃度の発生速度に与える影響は，1EM 以前の初期発生の段階であらわれ，それ以後ではほとんどないものと考えられる。

謝　　辞

本研究を行うにあたり，タイ国よりミナミカブトガニおよびマルオカブトガニを送って下さった，Srinakharinwirot 大学の Smarn Srithunya 教授に深く感謝する。また，実験条件下での卵の飼育に協力された小林亮二，木次克彦両氏およびカブトガニ類4種の飼育保管などに協力された筑波大学下田臨海実験センターの方々に感謝する。

摘　　要

杉田博昭（筑波大学生物科学系，〒305茨城県新治郡桜村天王台1-1-1），村上公信（流山中央高等学校，〒207-01千葉県流山市大畔275-5），関口晃一（上武大学商学部，〒372群馬県伊勢崎市戸谷塚町634-1）：カブトガニ類の胚発生に及ぼす塩分濃度の影響。

カブトガニ類は大潮の満潮時頃に海岸や河口の満潮線近くの砂中に産卵する。佐賀県伊万里市多々良海岸のカブトガニが産卵中の海水の塩分濃度は18〜33‰であった。このようなことから，カブトガニ類の発生中の卵や胚は塩分濃度のかなりの低下に耐えられるものと思われる。本実験では，4種のカブトガニ類，カブトガニ（*Tachypleus tridentatus*），ミナミカブトガニ（*T. gigas*），マルオカブトガニ（*Carcinoscorpius rotundicauda*），およびアメリカカブトガニ（*Limulus polyphemus*）の卵を人工受精させ孵化するまで5‰から35‰の海水中で飼育し，それらの発生率および発生速度を調べた。

カブトガニとアメリカカブトガニの胚は測定された産卵地の海水の塩分濃度の低下に十分よく適応して発生できた。またマルオカブトガニとミナミカブトガニも低塩分濃度下で十分よく発生した。

マルオカブトガニだけが，大潮の上潮に乗って河を溯り河岸に産卵するので，本種が最もよく低塩分濃度に耐性があると推測されたが，実際には低塩分濃度下での発生率は4種の中で一番低かった。

引　用　文　献

Ayers, J.C., 1959. The hydrography of Barnstable Harbor, Massachusetts. *Limnol. Oceanogr.*, **4**: 448-462.

Cole, W.H., 1940. The composition of fluids and sera of some marine animals and of the sea water in which they live. *J. Gen. Physiol.*, **23**: 575-584.

Dailey, M.E., F. Fremont-Smith & M.P. Carroll, 1931. The relative composition of sea water and of the blood of *Limulus polyphemus*. *J. Biol. Chem.*, **93**: 17-24.

Garrey, W.E., 1905. The osmotic pressure of sea water and of the blood of marine animals. *Biol. Bull.*, **8**: 257-270.

Jegla, T.C. & J.D. Costlow, 1982. Temperature and salinity effects on developmental and early posthatch stages of *Limulus*. p. 103-113. *In* J. Bonaventura, C. Bonaventura & S. Tesh (eds.), Physiology and Biology of Horseshoe Crabs Sutdies on Normal and Environmentally Stressed Animals. Alan R. Liss, Inc., New York.

Laughlin, R., 1983. The effects of temperature and salinity on larval growth of the horseshoe crab *Limulus polyphemus*. *Biol. Bull.*, **164**: 93-103.

Robertson, J.D., 1970. Osmotic and ionic regulation in the horseshoe crab *Limulus polyphemus* (Linnaeus). *Biol. Bull.*, **138**: 157-183.

関口晃一，1971. カブトガニの生態と人工増殖. 動物と自然，**1**: 5-8.

Sekiguchi, K., 1973. A normal plate of the development of the Japanese horse-shoe crab, *Tachypleus tridentatus*. *Sci. Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku, Sect. B*, **15**: 153-162.

Sekiguchi, K., S. Nishiwaki, T. Makioka, S. Srithunya, S. Machjajib, K. Nakamura & T. Yamasaki, 1977. A study on the egg-laying habits of the horseshoe crabs,

Tachypleus gigas and *Carcinoscorpius rotundicauda*, in Chonburi area of Thailand. *Proc. Jap. Soc. Syst. Zool.*, (**13**) : 39-45.

SEKIGUCHI, K., Y. YAMAMICHI & J. D. COSTLOW, 1982. Horseshoe crab developmental studies I. Normal embryonic development of *Limulus polyphemus* compared with *Tachypleus tridentatus*. p. 53-73. *In* Physiology and Biology of Horseshoe Crabs Studies on Normal and Environmentally Stressed Animals. Alan R. Liss, Inc., New York.

SUGITA, H. & K. SEKIGUCHI, 1981. Swelling mechanism of the embryo of the Japanese horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus*. *Zool. Mag.*, **90**: 271-282.